

## 明 細 書

### 新規なタンパク質高産生組換え動物細胞、その作製方法及びそれを用いたタンパク質を大量産生する方法

#### 技術分野

[0001] 本願発明は、タンパク質を高生産する組換え動物細胞の作製方法及びそれを用いたタンパク質生合成活性を大量産生する方法に関する。更に詳細には、バキュロウイルスP35に代表されるタンパク質生合成活性を増加させる因子及び／又は、抗アポトーシス活性を有する因子、中でもカスパー活性を直接阻害する因子の遺伝子を動物細胞に導入することによって目的タンパク質を多量に産生する組換え動物細胞を作製し、その遺伝子を発現させることによって目的タンパク質の産生量を増加する方法に関する。

#### 背景技術

[0002] 近年、遺伝子組換え技術を用いて医薬品などに利用可能なタンパク質を作る試みが盛んに行われている。分子サイズの大きなタンパク質や糖鎖の付加など種々の修飾、また複数のポリペプチド鎖からなるサブユニット構造のタンパク質は、酵母や大腸菌などの微生物を宿主とした発現系では対応できないので、動物細胞を宿主とした産生系を用いる場合が多い。動物細胞の中でも哺乳動物細胞を用いて産生させる場合が多い。タンパク質が分泌タンパク質の場合、培養上清に目的タンパク質が回収できるので、一般的に、適当な培地中で組換え動物細胞を培養し、一定期間培養した後、培養上清を一括して回収する(バッチ培養)か、随時適当量の培地の抜き取り、添加を連続的に行う方法(パフュージョン培養)が用いられている。いずれにしても、目的分泌タンパク質を産生する組換え動物細胞の数の増加とともに分泌タンパク質の培地への蓄積(産生)量が増加する。細胞の増殖は、細胞が対数的に増殖する対数期と細胞数が見かけ上一定の定常期、それから細胞が死滅し、数が減少する死滅期の3つの期間に分けられる。分泌タンパク質の産生を増加させるためには、定常期での組換え動物細胞の細胞密度を可能な限り高くし、その期間をできるだけ長く維持することが重要である。特に、バッチ培養の場合、一定量の培地の中で組換え

動物細胞を増殖させるので、この中で分泌タンパク質の産生量を伸ばすために定常期の細胞密度を可能な限り高くし、なおかつその時期をできるだけ維持しようと様々な試みがなされてきた。

[0003] 定常期を長く維持する試みとして、育種の観点から、培地成分に改良を加え、増殖因子添加など栄養成分を工夫することで増殖性を良くし、定常期を延長させる方法がとられてきた。また、培養方法として、フェドバッチ培養法のように定常期の細胞に対して栄養分の追加補充を適当なインターバルで行い、栄養枯渇を防ぐことによって、定常期を長く伸ばす方法がある。灌流(パフュージョン)法はこれを連続的に行う方法である。目的タンパク質の産生量を増加させるために、通常はこのような育種的な方法がとられてきた。このような育種的な方法とは別の方法として、宿主細胞を改造する試みも行われてきた。例えば、細胞死抑制因子(anti-apoptotic factor)を用いる方法が試みられている。この方法は細胞死抑制因子遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞中で発現させ、その細胞に栄養飢餓などによって生じるプログラムされた細胞死(アポトーシス)を抑制する能力を付与し、定常期を延長しようという試みである。

[0004] アポトーシスの起こるメカニズムとして非特許文献1によれば、次のように考えられている。栄養枯渇などの様々な細胞死刺激が細胞に伝わると転写因子やキナーゼを含む各種タンパク質を介して、そのシグナルはミトコンドリアに伝達される。シグナルを受けたミトコンドリアはアポトーシスシグナル伝達因子(AIF、シトクロムcなど)を細胞質中に放出する。シトクロムcは細胞質に存在するApaf-1(apoptosis activating factor-1)とpro-caspase-9に結合し複合体を形成し、caspase-9を活性化する。活性化されたカスパーカスケードは細胞質内あるいは核内の各種基質を切断し、様々なアポトーシスに特徴的な形態学的、生化学的変化(アクチン分解、DNA断片化、染色体凝集など)を誘導する。このようなアポトーシスを抑制する因子としてBcl-2(B cell lymphoma/leukemia 2)がよく知られている。Bcl-2遺伝子はヒト濾胞性リンパ腫に高頻度に見られる癌遺伝子として発見された。現在Bcl-2に相同性の高いドメイン(BH1-4)をもつ多くのファミリー遺伝子が同定されている。ファミリーにはアポトーシスに抑制的に働く因子と促進的に働く因子があり、抑制的因子として、例えばBcl-xL、

Bcl-w、Mcl-1、A1、BHRF1、E1B-19K、Ced-9などが知られており、前述のシトクロムc放出阻害や、Apaf-1とprocaspase-9に結合することによってシグナル伝達を阻止していると考えられている。このように抑制的なBcl-2ファミリーはカスパーカスケードの上流で機能すると考えられている。

- [0005] 一方、カスパーカスケードの下流に作用(カスパーの活性を直接的に阻害)して細胞死抑制効果を示す因子も知られている。例えば、バキュロウイルス科に属するAcNPV (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*)のp35タンパク質はカスパーの基質として切断され、その断片がほとんど全てのカスパーと安定的な複合体を形成してその活性を阻害する。従って、種々のアポトーシスを抑制することができる。AcNPVに近縁なBmNPV (*Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*)もp35遺伝子を持っている。また、牛痘ウイルスのcrmAはcaspase-1様プロテアーゼやcaspase-8,-10に特異的に結合し、これを阻害することによりアポトーシスを抑制できる。また、ヘルペスウイルス由来のv-FLIPは2つのDED(death effector domain)ドメインを持ち、FADD (Fas-associating Protein with death domain)と結合することによってcaspase-8の活性化を抑制する。さらに、バキュロウイルス科のCpGV(*Cidipoma pomonella granulosis virus*)やOpMNPV (*Orgyia pseudotsugata multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus*)をはじめとする多くの類縁のウイルスには、p35遺伝子とは別に、その発現産物がカスパー活性を直接阻害するv-IAP(inhibitor of apoptosis)遺伝子が同定されている。現在までにv-IAPのホモログとして、ウイルス以外にショウジョウバエや哺乳類でc-IAP1/hia-2、c-IAP2/hia-1、XIAP、NAIP、survivin、TIAP、Apollon、DIAP1、DIAP2、SfiAP、ITAなど数種類のBIR (baculovirus IAP repeat)を持つIAPファミリーが同定されている。

- [0006] このような抗アポトーシス活性をもつ因子、例えばBcl-2ファミリーなどを細胞培養に利用しようと試みられてきたが、今のところ、Bcl-2ファミリーについてはタンパク質の産生量増強に対する効果ははっきりしていない。例えば、Tey BTらはキメラ抗体を産生するCHO細胞にBcl-2遺伝子を導入して発現させた場合に

、生存率の延長効果を認めたが、抗体産生量に変化はなかった(非特許文献2参照)。  
Simpson

NHらはハイブリドーマにBcl-2遺伝子を導入したが、やはり抗体産生能力の上昇にはつながらなかった(非特許文献3参照)。同様に、Kim NS, Lee GMらも、バッチ培養においてBcl-2遺伝子を発現させた抗体産生CHO細胞は発現させない場合に比べて抗体産生量にほとんど変化は認められないことを報告している(非特許文献4、5参照)。一方、彼らは酪酸ナトリウムを同時に添加した場合に酪酸の持つアポトーシス誘導作用をBcl-2が抑制し、結果的に酪酸の持つ産生量増強作用を強化することによって抗体産生量をアップさせている(非特許文献5参照)。

また、彼らは同様にBcl-2発現が高浸透圧による細胞死を抑制することを見出し、高浸透圧による抗体産生増強効果を助けることによって、産生量アップできることを報告している(非特許文献6参照)。

これらの報告は、Bcl-2が細胞死抑制効果を発揮しても、抗体のような分泌タンパク質の産生量増強効果に直接的に関わるものでないことを示している。また、Bcl-2、Bcl-xL、E1B-19Kの発現は細胞増殖を減じる方向に作用することも報告されている(非特許文献7参照)。同様に、Bcl-2ファミリーであるMCL-1も細胞の生存率を向上させるが、細胞増殖のシグナルに影響を与えない(非特許文献8参照)。Bcl-xLについても同様に細胞生存率を向上させるが、分泌タンパク質の産生量向上には寄与しないとの報告がある。例えば、インスリンのプロモーターの制御下でBcl-xLを発現できるようにした遺伝子を導入されたトランスジェニックマウスにおいて、Bcl-xLは $\beta$ 細胞の生存率を向上させたが、グルコース誘導によるインスリンの分泌発現を増強するどころか減少させた(非特許文献9参照)。同様に、Bcl-xLを発現させたRAW264マクロファージ細胞を用いてLPS誘導によるTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生を調べたところ、産生量を減少させている(非特許文献10参照)。同様にBcl-2ファミリーであるE1B-19K遺伝子を抗体産生NS/0ミエローマに導入したが、産生量について改善は認められなかった(非特許文献11参照)。

[0007] このように、これまで試されたBcl-2、Bcl-xL、E1B-19KなどのBcl-2ファミリー由来の細胞死抑制因子を用いた方法はいずれも細胞死を抑制し、増殖曲線の定常期を延

長することができたにもかかわらず、期待通りには産生量が増加しない場合が多い。これらのことから、これらの因子には直接的なタンパク質の産生量を増強する効果はないか、あっても特殊な環境下で発揮されると考えられる。一方、バキュロウイルスのP35に代表されるカススペース阻害作用を持つ因子については組換えタンパク質産生細胞において産生量増強効果との関連を調べたとの報告はなく、ましてや組換え分泌タンパク質産生細胞においてその産生量増強効果があるとの報告などなかった。

[0008] 本発明では本発明の対象とするタンパク質の一例としてフィブリノゲン及びエカリン、第VIII因子を用いている。フィブリノゲンは、血液凝固因子の一つとして、生体が傷害を受けた時に血液を凝固する働きを担う。第一の機能は損傷部位でフィブリンクロットと呼ばれる血栓の本体を形成することであり、第二の機能は、血小板凝集に必要な粘着タンパク質として働くことである。フィブリノゲンの血中濃度は、通常約3mg/mlであり、アルブミン、免疫グロブリンGについて3番目に高い。フィブリノゲンは、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖及び $\gamma$ 鎖と呼ばれる3種の異なったポリペプチドを2本ずつ有する計6本のポリペプチドからなる巨大糖蛋白質である。ポリペプチドの個々の分子量は $\alpha$ 鎖が約67000、 $\beta$ 鎖が約56000、 $\gamma$ 鎖が約47500であり、これらが集合したフィブリノゲンの分子量は、約340000に達する(非特許文献12参照)。血中のフィブリノゲンには、分子サイズの異なる異型ポリペプチドを有することに起因するヘテロな分子が存在する。例えば、 $\gamma$ 鎖には $\gamma'$ 鎖(あるいは $\gamma$ B鎖)と呼ばれる異型の存在が報告されており、これは、 $\gamma$ 鎖のアミノ酸配列の408位に20個のアミノ酸残基が付加した計427個のアミノ酸残基からなるポリペプチドであることが明らかにされている(非特許文献13参照)。また、 $\alpha$ 鎖にも $\alpha$ Eと呼ばれる異型が存在し、このポリペプチドは、 $\alpha$ 鎖のアミノ酸配列の612位に236個のアミノ酸残基が伸長した計847個のアミノ酸残基を有することが報告されている(非特許文献14参照)。

[0009] フィブリノゲン製剤は、静脈投与するなどの方法により血液中のフィブリノゲン濃度を高めることによって重篤な出血を阻止するのに効果的であり、たとえば敗血症における汎発性血管内凝固症候群(DIC)のような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。

また、フィブリンの膠着性を利用した組織接着剤としても広く利用されている(非特

許文献15参照)。この生体由来接着剤は、フィブリノゲンが生体内でゲル化することを利用したもので、止血、創傷部位の閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアーリークの閉鎖など広範にわたって使用される。また、近年フィブリノゲンをコラーゲンなどのシートに付着させることにより利便性を高めた製剤も販売されている。

[0010] 現在、医薬品として用いられているフィブリノゲンはヒト血漿から調製されたもので、その問題点として、1) 不特定多数のヒトから集めた血漿を使用するために、HAV、HBV、HCV、HEV、TTVなどの肝炎を引き起こすウイルス、HIVなどの免疫不全症を引き起こすウイルス、CJDを引き起こす異常プリオンなどの感染性病原体混入の危険性があること、2) また、日本では血漿は献血によって供給されており、将来的な安定供給が問題視されること、などが挙げられている。

これらの問題を解決するために、従来からフィブリノゲンの組換え化が試みられてきた。例えば、大腸菌では、フィブリノゲン $\gamma$ 鎖の菌体内発現には成功しているが、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3つのタンパク質を同時に発現させ、機能的なフィブリノゲン分子を産生させたとの報告はない。また、酵母を用いた発現系でも一時期分泌発現に成功したとの報告もあったが、最終的には再現性が取れずその報告を取り下げている(非特許文献16参照)。このように、未だ、大腸菌や酵母を用いてフィブリノゲンを発現させることに成功したとの報告はない。

[0011] 一方、エカリンはEchis carinatusより単離精製された(非特許文献17)蛇毒由来のプロテアーゼで、血液凝固について重要な働きをするプロトロンビンの特異的に活性型トロンビンに変換することが知られている。医薬品として用いられているトロンビンは、止血剤として使用されている。通常、結紮によって止血困難な小血管、毛細血管および実質臓器からの出血(例えば、外傷に伴う出血、手術中の出血、骨性出血、膀胱出血、抜歯後の出血、鼻出血および胃潰瘍などの上部消化管からの出血など)に使用されている。現在のトロンビン製剤は、ウシ血液由来もしくはヒト血漿から調製されたもので、その問題点として、1) 感染性病原体混入の危険性があること、2) 将来的な安定供給が問題視されること、などフィブリノゲンと同様の問題点を抱えており、組換え技術によって得られた

トロンビンが望まれている。このようなトロンビンを作る際には、初めから活性型のトロンビンとして産生させることは難しく、プロトロンビンとして産生させてから、何らかの酵素を用いて活性化する必要があった。その効率的な変換酵素としてエカリンが候補に挙げられているが、エカリンも毒ヘビ由来であり、その供給や感染性病原体混入の問題を抱えており、組換え化が望まれていた。また、エカリンはビタミンK不存在下で生合成される異常プロトロンビンに対しても作用するので、異常プロトロンビンの血中濃度の測定に利用されている。しかし、蛇毒からは少量しか精製できず、一般的な試薬として用いることができなかった。すなわち、組換え技術によって得られたエカリンを大量に供給することは、組換え技術によって作られたトロンビン製剤の製造工程に必須であり、また臨床診断薬としても、従来からエカリンの実用化に向け、高産生化が望まれていた。

[0012] 第VIII因子は血液凝固反応において、活性型第IX因子が第X因子を活性化する反応を約20万倍増幅する重要な凝固因子である。第VIII因子が欠乏すると重篤な出血傾向をきたすことになり、これは血友病Aとして知られている。血友病Aは血液凝固第VIII因子の欠乏に基づく先天性の出血性疾患で、通常男性に発症し、発生率は男子出生5千〜1万人に1人とされている。出血症状は乳児期以降から始まることが多く、一般に皮下、関節内、筋肉内、血尿、口腔内、頭蓋内などに出現する。関節内出血を繰り返すと関節障害が進行し、関節の可動制限を伴う慢性の血友病性関節症をきたす。血友病Aの治療は第VIII因子製剤の静脈注射が原則とされている。現在、血液由来の第VIII因子製剤と組換え製剤の両方が販売されているが、血液由来は前述のように感染性病原体混入のリスクと安定供給の問題がある。一方、組換え製剤についても、欠品を生じて供給不足になり社会問題になった。これらの問題を解決するために、組換え製剤の増産に必要な高産生化が望まれていた。

[0013] フィブリノゲンの場合、動物細胞では、BHK細胞(非特許文献18参照)やCOS細胞(非特許文献19参照)、CHO細胞(非特許文献20、21、22及び特許文献1参照)を用いて発現が試みられているが、その産生量は、1〜15  $\mu$ g/ml程度にとどまっている。これらの場合、メタロチオネインプロモーター、Rous sarcoma virus LTRプロモーター、adenovirus 2 major late プロモーターの何れかを

用い、選択マーカーとしてアミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、histidinol耐性遺伝子の何れか若しくはこれらの組み合わせで使用している。いずれの場合も、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖を各々コードする遺伝子の発現ベクターを各々単独に構築し、3者で同時にトランスフェクションするか、あるいは $\alpha$ 鎖、 $\gamma$ 鎖若しくは $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖遺伝子を有する各々2つの発現ベクターで先に形質転換した細胞に、後から $\beta$ 鎖、 $\alpha$ 鎖遺伝子を有する発現ベクターを導入する方法、さらには $\alpha$ 鎖と $\gamma$ 鎖遺伝子を有するプラスミドと $\beta$ 鎖遺伝子を有するプラスミドを等量混合して導入する方法がとられている。いずれの場合も特に導入する際の各遺伝子の構成比に関する記載はなく、一般的な手法通りに各遺伝子を均等に導入していると思われる。現在使用されている血液由来のフィブリノゲンを用いた医薬品では、例えば、フィブリン糊製剤では約80mg/doseのフィブリノゲンが使われており、前述の十数 $\mu$ g/ml程度の発現量では製造施設が大規模にならざるを得ず、必然的に高コストになってしまう。遺伝子組換え技術によりフィブリノゲンを実用的なレベルで製造するためには高産生細胞(例えば、フィブリノゲンの発現量が100 $\mu$ g/ml以上)が必要であるが、現在、これを満足する組換え動物細胞を用いた発現系の報告はみられない。

[0014] 特許文献1:United StatesPatent 6037457

[0015] 非特許文献1:「アポトーシスと疾患 中枢神経系疾患編」水野美邦編、医薬ジャーナル(2000)

非特許文献2:Tey BTら,Biotechnol. Bioeng., 68, 31 (2000)

非特許文献3:Simpson NHら,Biotechnol. Bioeng., 64, 174 (1999)

非特許文献4:Kim NSとLee GM,Biotechnol. Bioeng., 82, 872 (2003)

非特許文献5:Kim NSとLee GM,Biotechnol. Bioeng., 71, 184 (2000/2001)

非特許文献6:Kim NSとLee GM,J. Biotechnol., 95, 237 (2002)

非特許文献7:O'Reilly LAら,EMBO J., 15, 6979 (1996)

非特許文献8:Yang Tら, J CellPhysiol., 166, 523 (1996)

非特許文献9:Zhou Yら, Am. J.Physiol. Endocrinol. Metab., 278, E340 (2000)

非特許文献10:Lakics Vら, J.Immuno., 165, 2729 (2000)



- 非特許文献11: Mercille Sら, Biotechnol. Bioeng., 63, 516 (1999)
- 非特許文献12: 「止血・血栓・線溶」松田、鈴木編集、中外医学社(1994)
- 非特許文献13: Chung DEとDavie EW, Biochemistry, 23, 4232 (1984)
- 非特許文献14: Lawrence YFら, Biochemistry, 31, 11968 (1992)
- 非特許文献15: 「特集・生体接着剤」Biomedical Perspectives, 6, 9-72 (1997)
- 非特許文献16: Redman CMとKudryk B, J. Biol. Chem., 274, 554 (1999)
- 非特許文献17: T. Moritaら: J. Biochemistry, 83, 559-570, (1978)
- 非特許文献18: Farrell DHら, Biochemistry, 30, 9414 (1991)
- 非特許文献19: Roy SNら, J. Biol. Chem., 266, 4758 (1991)
- 非特許文献20: Lord STら, Blood Coagul Fibrinolysis, 4, 55 (1993)
- 非特許文献21: Binnie CGら, Biochemistry, 32, 107 (1993)
- 非特許文献22: Lord STら, Biochemistry, 35, 2342 (1996)

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

- [0016] 以上述べてきたように、タンパク質、特に分泌タンパク質を産生している組換え動物細胞の培養においては産生量を増加させるために如何に細胞密度を高密度にするか、如何に増殖曲線の定常期を長く維持するかが問題となっていた。しかし、フェドバッチ培養のように枯渇した栄養因子を追加して定常期を延長させる方法や、アミノ酸や増殖因子を加えるなど栄養条件を良くして細胞の増殖性を上げ、細胞密度を上げる方法などの育種方法以外に効果的な解決策は見出されていないのが現状であった。従って、育種的な方法に代わる、あるいは育種的な方法と併用できる細胞の培養条件を改善・改良する新たな方法が望まれていた。
- [0017] 従って、本願発明は、育種的な方法以外にタンパク質、特に分泌タンパク質を産生している組換え動物細胞の培養条件を改善・改良する方法を提供することを目的とする。
- [0018] また、本願発明の他の目的は、当該方法によって得られるタンパク質、特に分泌タンパク質を高産生する組換え動物細胞ならびに当該方法によって得られたタンパク質を提供することにある。

## 課題を解決するための手段

[0019] 本願発明者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、産生されるタンパク質の一例として従来技術では大量産生の難しかったフィブリノゲン及びエカリン、第VIII因子を用い、タンパク質生合成活性を増加させる作用及び/又は抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカススペース活性を阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、望ましくはバキュロウイルスP35遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞内で発現させることにより、従来になかったタンパク質産生能の増強効果を見出し、本願発明を完成するに至った。さらに、この産生量の増強は、この因子が産生量の増強要因としてタンパク質生合成活性の増強に寄与した場合と、アポトーシス活性阻害に寄与した場合との2通りが考えられることを明らかにし、前者の場合は、アポトーシスの発生時期まで待たなくとも産生量の増強が得られるため、培地を選ばず、産業上の利用価値が非常に高いことが判明した。

[0020] 従って、本願発明は、タンパク質生合成活性を増加させる作用及び/又は抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカススペース活性を阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、望ましくはバキュロウイルスP35遺伝子を用いて動物細胞を形質転換する工程を含む組換え動物細胞の作製方法を包含する。

[0021] また、本願発明は、上記の方法により得られたタンパク質を高発現する組換えタンパク質産生細胞及び当該細胞によって得られたタンパク質を包含する。

## 発明の効果

[0022] 本願発明の方法によって作製された目的タンパク質を高産生する動物細胞は、細胞増殖における定常期の期間を延長する以外に、細胞増殖能力や、細胞あたりの産生量増強を増強する効果も認められ、従来Bcl-2などで報告されていた生存率の延長効果以外の能力も獲得できるようになる。フィブリノゲン産生細胞及びバキュロウイルスP35を一例としてその効果を調べた結果、従来技術によるフィブリノゲンの産生量は最大約15  $\mu$ g/mlであったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合でスピナー培養レベルに約42倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約704～3952  $\mu$ g/mlの潜在的な産生量をもつと推定される。このように本願発明の方法によって、これまでにない目的タンパク質を高産生する

組換え動物細胞が得られる。

[0023] 従来のアポトーシス抑制活性による産生増強効果は、栄養状態の悪くなる培養後期、酪酸などのように細胞毒性を示す濃度域で発現増強活性を示すような薬剤や細胞毒性を示すような何らかの因子との混合培養などタンパク質産生細胞にアポトーシスを誘導する条件下での培養に置いて最も良く効果を示すと考えられてきた。本願発明は、このような特殊条件下でなく、一般的な培養条件下、すなわち通常の生存率が低下しない時期での培養にも効果を発揮する。この点が、これまでのアポトーシス抑制因子による産生量増強とは明確に異なる。本願発明は、フェドバッチ培養やパフュージョン培養(灌流)培養など既存の育種方法との併用も可能であり、組換え動物細胞のタンパク質産生能をさらに増強することができる。故に、本願発明は、従来では動物細胞での生産性が低く、産業化が難しかったタンパク質の事業化ならびに、すでに事業化されているタンパク質生産においてもさらなる産生量増強による大幅なコストダウンを可能にするものである。

[0024] 本願発明の一例として示した組換えヒトフィブリノゲン産生細胞やエカリン産生細胞、第VIII因子産生細胞においても、本願発明によって初めて実用的なレベルでのヒトフィブリノゲンやエカリン、第VIII因子の製造方法の確立を可能にし、当該製造方法が確立されることによってヒトフィブリノゲンやエカリン、第VIII因子の市場への安定供給が確保される。また、本願発明の方法より得られる組換えヒトフィブリノゲン産生細胞やエカリン産生細胞、第VIII因子産生細胞を用いれば、従来の血液を原料として製造した場合に危惧される感染性病2原体の混入やその他の血液由来成分の関与を排除することができ、より安全な血液製剤を製造・供給することが可能となる。

#### 図面の簡単な説明

[0025] [図1]組換えフィブリノゲン産生細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

[図2]バキュロウイルスP35遺伝子発現細胞を作製するための発現ベクターを示した図面である。

[図3]バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示し

た図である。

[図4]バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

[図5]バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、フィブリノゲン産生量についての経時変化を示した図である。

[図6]バキュロウイルスP35遺伝子を発現している細胞と発現していない細胞のスピナー培養における細胞密度、生存率、エカリン産生量についての経時変化を示した図である。

### 発明を実施するための最良の形態

- [0026] 本願発明の方法は、タンパク質を産生している宿主動物細胞にタンパク質生合成活性を増加させる作用及び/又は抗アポトーシス活性をもつ因子をコードする遺伝子、中でもカススペース活性を直接阻害する作用を持つ因子をコードする遺伝子、例えばバキュロウイルスP35遺伝子を、タンパク質を産生している組換え動物細胞内で発現させる工程を含むタンパク質を高産生する組換え動物細胞を用いる方法によって特徴付けられる。
- [0027] タンパク質生合成活性を増加させる作用及び/又はカススペースを阻害する作用を持つ因子としては、ウイルス由来のものであれば、バキュロウイルス(AcNPVあるいはBmNPV)のP35遺伝子、牛痘ウイルスcrmA遺伝子、ヘルペスウイルス由来のv-FLIP遺伝子、バキュロウイルスv-IAP遺伝子、アデノウイルスAd14.7遺伝子、バキュロウイルス由来v-IAPとホモロジーのある他のウイルス性因子などが挙げられる。また、ウイルス由来以外のものであれば、バキュロウイルス由来v-IAPとホモロジーのある動物細胞由来のBIR (baculovirus IAP repeat)を持つIAPファミリーが挙げられる。そのような因子の例として、ショウジョウバエや哺乳類で見出されたc-IAP1/hia-2、c-IAP2/hia-1、XIAP、NAIP、survivin、TIAP、Apollon、DIAP1、DIAP2、SflAP、ITAなどが挙げられる。これらの因子のように、ペプチド性抑制因子、タンパク質抑制因子など遺伝子発現により得られ

るものであれば、本願発明に適応できる可能性がある。これらの因子の中でもバキュロウイルスAcNPVのP35遺伝子が最も好ましい一例としてあげられる。

[0028] 産生量増強の対象となるタンパク質であるが、各種宿主動物細胞に遺伝子を導入することによって発現させることができるタンパク質であれば、どのようなタンパク質でも対象となるが、望ましくは宿主細胞の増殖とともに産生量も増加するタンパク質が対象となる。さらに、そのようなタンパク質の中でも、培養上清中に発現産物が回収できる分泌タンパク質が最も望ましい対象タンパク質である。そのようなタンパク質の例として、抗体、サイトカイン類、成長因子類、ホルモン類、血漿タンパク質、酵素類、レセプター、リガンド、代謝産物、ウイルス、ウイルスタンパク質などが挙げられる。本願発明では、そのようなタンパク質の一例として、ヒト由来のフィブリノゲンやエカリン、第VIII因子を取り扱うが、これに限定されるものではなく他のタンパク質産生細胞を作製する方法としても用いることができる。

[0029] 本願発明で一例として用いているヒトフィブリノゲンの構成ポリペプチド、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖及び $\gamma$ 鎖をコードする遺伝子としては、最終的に発現産物がアッセンブルしてヒトフィブリノゲン分子を形成できる遺伝子であれば、cDNA及び染色体遺伝子の何れも使用できる。前述したように、 $\alpha$ 鎖及び $\gamma$ 鎖には、それぞれ $\alpha E$ 鎖及び $\gamma'$  ( $\gamma B$ ) 鎖と呼ばれる異型が存在する。これらに加えて今後新たに見出されるかもしれない他の異型ポリペプチドをコードする遺伝子も、同様に、本願発明に使用することが可能である。

[0030] これまで述べてきた所望の遺伝子は、それぞれの遺伝子の核酸塩基配列を記した文献や、GENBANK(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)などの既存の遺伝子データベースを利用することによって核酸塩基配列を入手し、その配列を元にPCR用プライマーをデザインして適当な遺伝子ソースとなる細胞や組織、ウイルスのRNAやDNA、mRNA由来のDNAを鋳型として、通常のPCR法によりクローニングすることができる。例えばバキュロウイルスP35遺伝子の場合は、文献(Friesen, P.D. and Miller, L.K., J. Virol. 61, 2264-2272 (1987))に報告されている配列、エカリンの場合は、Nishidaらの文献(Biochemistry, 34, 1771, 1995)に、第VIII因子の場合は、J. Gitschierらの文献(Nature, 312, 326,

1984)に、フィブリノゲン遺伝子の場合は、文献(Rixon MWら, Biochemistry, 22, 3237 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3244 (1983)、Chung DWら, Biochemistry, 22, 3250 (1983)、非特許文献13、14参照)に各々報告されている配列を元にPCR用プライマーをデザインし、前者の場合はバキュロウイルス感染細胞やウイルスゲノムそのものを鋳型にして、エカリンの場合はヘビ毒腺、後2者の場合はヒト肝臓など第VIII因子、フィブリノゲンを産生している臓器や細胞由来のcDNAを鋳型にしてPCRを行うことにより取得できる。

[0031] より具体的には、ウイルスゲノムDNAあるいはRNAは一般的には以下のような方法によって調製可能である。ウイルス感染細胞からDNAを抽出する場合、細胞沈査に対してSDS及びproteinaseKを含む可溶化バッファー(組成の一例:150mM-NaCl, 10mM-Tris-HCl pH8.0, 10mM-EDTA, 0.1%-SDS, proteinase K 100ug/ml)を10倍以上加え、37℃で数時間〜一夜、穏やかに振盪することで蛋白成分を分解する。その後は、通常のDNA抽出の手法に従い、フェノール処理、エタノール沈殿によりDNAを回収する(中西広樹・西方人著、バイオ実験イラストレイテッド第二巻、P117-123、1997、秀潤社)。一方、ウイルス粒子からDNAまたはRNAを抽出する場合は、まず培養上清あるいは増殖に用いた発育鶏卵の腔液から一般的には超遠心によりウイルス粒子を濃縮する方法が用いられる。超遠心の条件はウイルス毎に多少異なるが、主なウイルスの精製法についてはウイルス実験プロトコール(永井美之・石浜明監修、メジカルビュー社、1995年)に記載されている。精製されたウイルス粒子からの核酸の抽出に関しては、DNAウイルスの場合、感染細胞からの抽出法に準じて調整が可能である。一方、RNAウイルス(及び細胞からのRNA調整)の場合、種々の抽出キットが市販されており、各キットに添付されている手順に従うことでRNAの調整が可能である。一例をあげると、宝酒造のCatrimox-14

RNA Isolation Kit RIK 2.11wを用いた場合、RNAウイルスを含む液に、等量のCatrimox-14を混合し、5分間遠心することでRNAが沈査として回収される。例えば、バキュロウイルスP35遺伝子の場合、バキュロウイルス感染細胞あるいはバキュロウイルス液から前述のような方法でPCRの鋳型となるDNAを調製することが可能である。

[0032] フィブリノゲンの $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖及び $\gamma$ 鎖をコードするcDNAは、以下のように調製される

。まず、ヒト肝細胞から全RNAを抽出し、この中からmRNAを精製する。得られたmRNAをcDNAに変換した後、それぞれの遺伝子配列に合わせてデザインされたPCRプライマーを用い、PCR反応を行い、得られたPCR産物をプラスミドベクターに組み込み大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中から目的の蛋白をコードするcDNAを有するクローンを選択する。上記の全RNAの抽出には、市販のTRIzol試薬(GIBCO BRL社)、ISOGEN(ニッポンジーン社)等の試薬、mRNAの精製には、mRNA Purification Kit (Amersham BioSciences社)などの市販キット、cDNAへの変換には、SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning (GIBCO BRL社)などの市販のcDNAライブラリー作製キットがそれぞれ使用される。ヒトフィブリノゲン遺伝子を取得する場合は、市販のcDNAライブラリー、例えば、Human Liver Marathon-Ready cDNA (BD Bioscience) が用いられる。

[0033] PCR用プライマーは、DNA合成受託機関(例えばQIAGEN社)などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5'側にKOZAK配列(Kozak M, J.Mol.Biol., 196, 947 (1987))及び適切な制限酵素切断部位の配列を付加することが望ましい。好ましくは、配列番号1から6、10、11、14、15に記載の合成DNAがプライマーとして用いられる。PCR反応は、市販のAdvantage HF-2 PCR Kit(BD Bioscience)を用い、添付のプロトコールに従って行えばよい。PCRにより得られたDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット(インビトロジェン社)等を用いてクローニングした後、DNAシーケンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer(PEバイオシステムズ社)により決定される。

[0034] このようにして本願発明に必要な所望の遺伝子入手することができる。その一例として、バキュロウイルスP35遺伝子は、好ましくは配列番号12記載の配列を有する遺伝子断片として得られる。フィブリノゲン遺伝子は、好ましくは配列番号7から9記載の配列を有する遺伝子断片として得られる。また、エカリン遺伝子は、好ましくは配列番号13記載の遺伝子断片として、第VIII因子は、好ましくは配列番号16記載の遺伝子断片として、得られる。これらの遺伝子を用いて動物細胞に組み込む為の発現ベクターが構築される。動物細胞を宿主とする発現ベクターには特段の制約はないが、

プラスミド、ウイルスベクター等を用いることができる。当該発現ベクターに含まれるプロモーターは、宿主として用いる動物細胞との組み合わせにより、SV40初期、SV40後期、サイトメガロウイルスプロモーター、ニワトリ $\beta$ アクチンなど、最終的に所望の遺伝子産物が得られるのであれば如何なるものでも良い。また適当なエンハンサーと組み合わせても構わない。好ましくは、ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター系発現プラスミド pCAGG (特開平3-168087) が使用される。選択や遺伝子増幅のマーカー遺伝子として機能するものであればいかなるものでも使用可能である。一般的には、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラーゼ(neo)遺伝子やジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子、ピューロマイシン耐性酵素遺伝子、グルタミン合成酵素(GS)遺伝子など一般に知られる選択や遺伝子増幅用のマーカー遺伝子 (Kriegler M著、加藤郁之進 監訳、ラボマニュアル動物細胞の遺伝子工学、宝酒造(1994)) が利用できる。

- [0035] 以上述べた要素を組み合わせる構築される発現ベクターの好ましい例として、バキュロウイルスP35遺伝子の場合には、図2に示すベクターが挙げられる。フィブリノゲン遺伝子の場合には、 $\gamma$ 鎖及び $\beta$ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターと $\gamma$ 鎖及び $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子を有する発現ベクターが挙げられる。より好ましくは、図1に示すpCAGGD-GB(フィブリノゲン $\gamma$ 鎖と $\beta$ 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカーとしてdhfr遺伝子を持つ)とpCAGGDN5-GA(フィブリノゲン $\gamma$ 鎖と $\alpha$ 鎖をコードする遺伝子を1個ずつ持ち、選択マーカーとしてdhfr遺伝子及びneo遺伝子を持つ)が挙げられる。この3種類の発現ベクターは、動物細胞に導入される。しかしながら、本願発明はこれらの例に限定されるものではない。基本的にタンパク質合成活性増強作用を持つバキュロウイルスP35遺伝子に代表されるカススペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子と、エカリン、第VIII因子またはフィブリノゲンを構成する $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3種の遺伝子に代表される目的タンパク質遺伝子が同一細胞内で同時に発現できる形であれば特段の制限はない。バキュロウイルスP35遺伝子に代表されるカススペース活性阻害作用を持つ因子をコードする遺伝子の発現ベクターと、エカリン、第VIII因子やフィブリノゲンを構成する $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3種の遺伝子に代表される目的タンパク質遺伝子の発現ベクターの導入時期や導入



の順番にも特段の制限はない。例えば、宿主細胞にタンパク質生合成活性増強作用をもつ因子をコードする遺伝子の発現ベクターと目的タンパク質発現ベクターを同時に導入しても良いし、別々の時期に導入しても構わない。予め宿主細胞にタンパク質生合成活性増強作用をもつ因子をコードする遺伝子の発現ベクターを導入して新たな宿主細胞とすれば、より一層汎用性が増す。ただし、タンパク質生合成活性増強作用をもつ因子をコードする遺伝子を有する発現ベクターと目的のタンパク質遺伝子を有する発現ベクターとを別々の時期に宿主細胞に導入させる場合には、それぞれの発現ベクターの持つ選択マーカー遺伝子に各々異なったものを使う必要がある。

[0036] 発現ベクターを導入する宿主細胞として、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞やSP2/0等マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞、COS細胞など様々な動物細胞が利用可能であるが、発現ベクターに使用されるプロモーター、選択及び遺伝子増幅用マーカー遺伝子に合わせて適当な細胞を選択すれば良い。例えば、ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター系発現プラスミドを用いて構築した発現ベクターには、BHK21細胞やCHO細胞DG44株などが使用される。

[0037] 宿主細胞の形質転換を行うときには公知の方法を利用すればよい。例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、リポフェクチン系のリポソームを用いる方法、プロトプラストポリエチレングリコール融合法、エレクトロポレーション法などが利用でき、使用する宿主細胞により適当な方法を選択すればよい(Molecular Cloning (3rd Ed.), Vol 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))。

[0038] 形質転換細胞の選択・増殖には、一般に動物細胞を形質転換する時に行われる方法を使用すればよい。例えば、形質転換後の細胞は、CHO-S-SFMII培地(GIBCO-BRL)、IS CHO-V培地(アイエスジャパン)、YMM培地等無血清培地やMEMアルファ培地、RPMI培地、ダルベッコMEM培地(いずれもGIBCO-BRL)に5-10%程度のウシ胎児血清を添加した血清培地などの一般的に動物細胞培養に用いられる培地に、使用する選択マーカーに合わせてメトトレキサート、G418、ピューロマイシン等を添加した選択培地を用いて、適宜培地交換をしながら、37℃前後で10-14日間程度培養される。この培養により、形質転換されていない細胞は死滅し、形質転換した細胞のみが増殖してくる。更に、形質転換細胞に対して、限界希釈法などの方法

により、目的とするタンパク質産生細胞株の選択及びクローン化が行われる。培養方法には、細胞の種類によって、また目的タンパク質の性状にあわせて種々の検出方法が使用可能である。一般的に、目的タンパク質の検出・発現量の測定には、蛋白質やポリペプチドの検出に用いられる方法、すなわち、ELISA, RIA, WB, SDS-PAGE等の方法を利用すれば良い。また、目的タンパク質が何らかの活性を保有する場合はその活性を直接測定しても良い。

[0039] このようにして得られた組換え動物細胞は、細胞増殖における定常期を延長する以外に、細胞増殖能力や、細胞あたりの産生量を増強させるタンパク質生合成活性を増強する効果も認められ、Bcl-2など従来の抗アポトーシス因子で報告されていた生存率の延長効果以外の能力も獲得できるようになる。そして最も重要な点は、目的タンパク質の産生量を従来報告がなかったほど大幅に増加させることができるようになる。

さらに本発明では、使用されるカススペース活性阻害活性及び/又はタンパク質生合成活性増強作用を持つ因子の持つ作用のうち、アポトーシス抑制活性を発揮できないような条件下、すなわち、培養細胞にアポトーシスが誘導されない条件下で培養しても十分な目的タンパク質産生増強効果が得られる。アポトーシス抑制活性が発揮できないような条件下の培養方法とは、例えば、新鮮な培地が絶えず供給される灌流培養方法あるいは新鮮培地や新たな栄養成分を培養途中で適宜追加するフェドバッチ培養方法、さらには培養後半での細胞の生存率低下を栄養成分の強化により抑制する培地を用いた培養方法などあげられる。また、通常のバッチ培養においても生存期間の延長無しに産生量増強が可能になる。

[0040] フィブリノゲン産生細胞または第VIII因子産生細胞、エカリン産生細胞及びバキュロウイルスP35を一例としてその効果を調べた結果、フィブリノゲンの場合、従来技術によるフィブリノゲンの産生量は最大約 $15 \mu\text{g/ml}$ であったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合スピナー培養レベルで約42倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子が導入された場合には単純計算で約 $704 \sim 3952 \mu\text{g/ml}$ の潜在的な産生量をもつと推定される。また、エカリンの産生量は導入前細胞の $5.96 \text{U/ml}$ に対して2.1～3.2倍の増強効果が認められた。第VIII因子産生細胞でも2.2～4.4倍の増強効果

が認められた。本願発明の方法によって、これまでにないタンパク質を高産生する組換え動物細胞が得られる効果が期待できる。本願発明は、前述のようにフェドバッチ培養、パフュージョン培養など育種方法との併用も可能であるので、組換え動物細胞の目的タンパク質産生能をさらに増強することができる。故に、本願発明は、従来の組換え動物細胞では生産が難しく、産業化が難しかったタンパク質の事業化ならびに、すでに事業化されているタンパク質生産においてもさらなる産生量増強による大幅なコストダウンを可能にするものである。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、東洋紡およびNew England BioLabs社、アマシャムファルマシア社、バイオラド社、シグマ社、ギブコBRL社製の試薬を使用した。

## 実施例 1

### [0041] (フィブリノゲン遺伝子の単離)

ヒトフィブリノゲン遺伝子は、Human

Liver Marathon-Ready cDNA (BD Bioscience)をテンプレートとし、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖用にそれぞれ2本ずつ作製し(配列番号1-6)、Advantage

HF-2 PCR Kit(BD Bioscience)を用いてキットのプロトコールに従ってPCR反応を行った。この結果、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖それぞれにPCR増幅のバンドが検出された。そのサイズは既知の $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖cDNA遺伝子のサイズと一致していたため、これらの遺伝子をTAクローニングキット(インビトロジェン)を用いてクローニング(各々pFbgA、pFbgB、pFbgG)し、その塩基配列の決定をABI

PRISM310 Genetic Analyzer (PEバイオシステムズ)を用いて行った。その結果、配列番号7-9にそれぞれ示すFbgA、FbgB、FbgG遺伝子が得られた。

## 実施例 2

### [0042] (フィブリノゲン遺伝子発現ベクターの構築)

本実施例に用いたフィブリノゲン $\beta$ 鎖及び $\gamma$ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGD-GBならびに、フィブリノゲン $\alpha$ 鎖及び $\gamma$ 鎖遺伝子発現ベクターpCAGGDN5-GAは以下

のようにして構築した。pCAGGD-GBについては、まず、pCAGG-S1 dhfr (WO 03/004641)をBamHIにて消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 dhfrNを構築し、このSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGGD-Gを構築した。さらに、pCAGG(Xho)(WO 03/004641)をSalIで消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてライゲーションすることによりpCAGG(Xho)Nを構築し、このプラスミドのXbaI-BamHIサイトに、pCAGG-S1 (WO 03/004641)のSalIを含むXbaI-BamHI断片を組み込み、得られたプラスミドのBamHIサイトを消化し、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化を行い、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 2Nを構築した。このpCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgB由来のFbgB遺伝子のSalI断片を組み込み、pCAGG-Bを構築した。pCAGGD-GのNotIサイトにpCAGG-BのFbgB遺伝子を含むNotI断片を組み込み、最終的なフィブリノゲン $\beta$ 鎖と $\gamma$ 鎖の発現ベクターpCAGGD-GB(図1)を構築した。

- [0043] 一方、pCAGGDN5-GAについては、最初にpCAGG-S1 dhfr neo (WO 03/004641)を不完全なBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、そのまま自己ライゲーションすることにより2つあるBamHIサイトのうちneo遺伝子の3'側にあるBamHIサイトを欠失させ、さらにBamHIで消化して、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、リン酸化NotIリンカー(宝)を用いてライゲーションすることによりpCAGG-S1 dhfr neoN (pCAGGDN5-NotI)を構築した。このpCAGG-S1 dhfr neoNのSalIサイトにpFbgG由来のFbgG遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したプラスミドのNotIサイトに、pCAGG-S1 2NのSalIサイトにpFbgA由来のFbgA遺伝子を含むSalI断片を挿入して構築したpCAGG-AのFbgA遺伝子を含むNotI断片を組み込み、pCAGGDN5-GA(図1)を構築した。

### 実施例 3

[0044] (組換えフィブリノゲン発現細胞の作製:発現ベクターの細胞への導入、遺伝子増幅、クローニング)

実施例2で構築したフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを用いて以下に述べる方法にて、CHO DG44 (Urlaub Gら, Somatic cell. Mol. Genet., 12, 555 (1986)、以下CHO)細胞を形質転換した。形質転換の前日にCHO細胞を6 well プレートに $1-0.5 \times 10^5$  cells/2ml/wellの細胞密度で10%ウシ胎児血清(FCS、GIBCO-BRL社製)を含むYMM培地(インシュリン・トランスフェリン・エタノールアミン・亜セレン酸ナトリウムを含むアミノ酸・ビタミンを強化した核酸不含MEMアルファ培地)を用い播種した。37°C、5%CO<sub>2</sub>培養装置で一夜培養の後、リポソーム系形質転換試薬、TransIT-LT1(宝)あるいはリポフェクトアミン2000(インビトロジェン)を用いて、あらかじめフィブリノゲン発現プラスミドpCAGGD-GB及びpCAGGDN5-GAを各々等量混合し、PvuIで消化・線状化しておいたものを導入DNAとして、それぞれのプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37°C、5%CO<sub>2</sub>培養装置で一夜培養した後、選択培地、10%透析FCS(d-FCS:GIBCO-BRL社製)、0.5 mg/ml Geneticin(G418:GIBCO-BRL社製)、100nM メトトレキサート(MTX:和光純薬工業製)を含むYMM培地、あるいは10% d-FCS、0.5 mg/ml G418を含むYMM培地に培地交換した。3〜4日毎に培地を交換しながら37°C、5%CO<sub>2</sub>培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

[0045] 得られた形質転換細胞のフィブリノゲン産生をELISAにて測定した。ELISAは以下に示す手順にて実施した。PBS(137mM NaCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O, 2.7mM KCl, 1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で10 µg/mlに調製した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体(Dako Cytomation) 100 µlをイムノモジュールプレート(ヌンク C8-445101)にアプライし、4 °Cに一晩置くことで固相化を行った。固相化したプレートの抗体溶液を除き、PBS 390 µlにて3回洗浄した。続いて、PBSで4倍に希釈したブロックエース(大日本製薬)を370 µlアプライし、室温で30分から2時間、ブロッキングを行った。ブロッキング後、

ブロッキング液を除き、サンプル(培養上清)およびスタンダードを100  $\mu$ lアプライした。サンプル(フィブリノゲン産生細胞の培養上清)は、PBSで10倍に希釈したブロックエースを用いて100〜800倍に希釈した。スタンダードには、Bolheal(化血研製:血漿由来のフィブリノゲンを含むバイアル1を規定通りに溶解し、そのフィブリノゲン量を80mg/mlとして計算し、PBSで1mg/mlに希釈した。)をサンプルと同じ希釈液にて100ng/ml〜1ng/mlに希釈したものをを用いた。サンプルおよびスタンダードは、プレートにアプライ後、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液(0.05% Tween-20/PBS) 390  $\mu$ lにて4回洗浄を行い、続いて、サンプル希釈に用いた溶液(PBSで10倍に希釈したブロックエース)で8000倍に希釈した抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体・パーオキシダーゼ標識を100  $\mu$ lアプライし、37℃で1時間反応させた。反応終了後、洗浄液(0.05% Tween-20/PBS) 390  $\mu$ lにて4回洗浄を行った。発色は、TMB Substrate Kit (Kirkegaard&Perry Laboratories, Inc.) 100  $\mu$ lをアプライし、暗所で30分静置後、1規定硫酸 100  $\mu$ lで反応を停止した。反応停止後30分以内に、プレートリーダー(モレキュラーデバイス)にて、450nm-650nmの吸光度を測定し、検量線からフィブリノゲン濃度を求めた。

[0046] このELISAにてフィブリノゲン産生能の高い形質転換細胞を選び出し、次にMTX遺伝子増幅を行った。10%

d-FCS、0.5 mg/ml G418を含み、段階的にMTX濃度を上げたYMM培地に細胞を懸濁し、24 well プレートに $5 \times 10^4$

cells / 0.5ml / wellにて播種し、3〜4日毎に培地を交換しながら37℃、5%CO<sub>2</sub> 培養装置で培養を続けることで選択を行い、高濃度のMTXに耐性の形質転換体を得た。その結果約20〜45  $\mu$ g/mlの産生量(細胞がコンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量)をもつ細胞が得られた。さらに、そのような組換えフィブリノゲン産生細胞のクローニングを行った。10%

d-FCSを含むYMM培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに1個/200  $\mu$ l/wellずつ播種することでクローニングを行った。得られたクローンについて、コンフル時に新しい培地に完全に交換し、一夜培養した培養上清中の産生量を調べたところ、〜56.8  $\mu$

g/mlに達するクローンが得られた。その中の一つのクローンCH002-24-4を10% d-FCS、0.5mg/ml G418、100 nM MTXを含むYMM培地に細胞を懸濁し、6 wellプレートに $2 \times 10^5$  cells/2ml/wellで播種し、4日間の培養を行い、培養上清中のフィブリノゲンの量をELISA法にて測定したところ、 $103.3 \mu\text{g/ml}$ に達しており、組換え動物細胞によるフィブリノゲンの産生量として $100 \mu\text{g/ml}$ のオーダーを初めて超えたことを示した。

#### 実施例 4

##### [0047] (組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養)

組換えフィブリノゲン産生細胞の無血清培養時の産生能を調べた。実施例3において $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の産生量を示したクローンCH002-24-4を、PBSにて2回洗浄後、表1に示す培地(CHO-S-SFMII、IS CHO-Vは無血清培地、10%d-FCS/YMMは血清培地)にそれぞれ懸濁し、 $10^5$  cells/mlで2ml/well of 6well プレートで播種し、4日間培養を行い、得られた細胞数のカウントと培養上清中のフィブリノゲン産生量を前述のELISAにて測定した。その結果、表1に示すように、 $1 \times 10^4$  cells 当たりのフィブリノゲン産生能は、血清培地(10%d-FCSを含むYMM培地)を用いた場合より高く、無血清培地でも血清培地と同等以上の産生能力があることが示された。このことは、一般的な高密度培養の場合 $1 \sim 2 \times 10^6$  cells/mlは達成可能であるので、培養条件さえ良ければ、単純計算で $440 \sim 1520 \mu\text{g/ml}$ 以上のフィブリノゲンを産生させる潜在能力があることを示している。

##### [0048] [表1]

培地	メーカー	産生量 ( $\mu\text{g}/1 \times 10^4$ cells)
10%d-FCS/YMM	自家調製	2.0
CHO-S-SFMII	GIBCO	4.4
IS CHO-V	アイエスジャパン	7.6

[0049] さらに、このCHO-S-SFMII培地で増殖したCH002-24-4細胞を、同じくCHO-S-SFMII培地を基本とした改良型無血清培地100mlに $1.6 \times 10^5$  cells/mlで播種し

、techne社製のスピナーフラスコを用いた約2週間の浮遊培養(回転数45rpm)で272.7  $\mu$ g/mlという産生量を達成した。このように、本願発明の方法により確立した細胞が、フィブリノゲン産生に関して無血清培地で一約270  $\mu$ g/mlの産生量を達成し、これまでにない高産生細胞であることが示された。

## 実施例 5

### [0050] (P35遺伝子のクローニングと発現ベクター構築)

#### バキュロウイルスAcNPV

(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: Invitrogenより購入)由来のウイルス液( $2 \times 10^7$  pf/ml)からプロテナーゼK処理、フェノール抽出によりウイルスゲノムを調製し、これを鋳型として、プライマーとしてKozak配列および必要な酵素siteを加えたものを5'用、3'用の2本作製し(配列番号10、11)、Advantage HF-2 PCR Kit(BD Bioscience)を用いてPCR反応を行った。PCR産物のサイズは既知のP35遺伝子のサイズと一致していたため、これをTAクローニング(Invitrogen)した。得られたプラスミドについて、その塩基配列の決定をABI PRISM310 Genetic Analyzer(PEバイオシステムズ)を用いて行った結果、文献(Friesen PD, Miller LK., J Virol. 61(7): 2264-72. 1987)の配列と同じ配列を持ったpP35遺伝子クローン(配列番号12)が得られた。

[0051] すでにフィブリノゲンを発現している細胞にP35遺伝子を導入するために、まず選択マーカーとしてpuromycin耐性遺伝子をもったベクターを構築した。23番目のセリンをアルギニンに変換した変異DHFRを持った発現プラスミドpCAGG-S1 mdhfr(WO 03/004641)のSapI、NotIサイト間にBamHIサイトを挿入するために、GGC CGC GGA TCC GCT CTT CC及びAGC GGA AGA GCG GAT CCG Cの2つのリンカーを合成し、リンカーライゲーションを行い、pCAGGM5を構築した。さらに、pCAGGM5のBamHI消化を行い、T4 DNAポリメラーゼによる末端平滑化後、XhoIリンカー(宝)を用いたリンカーライゲーションさせることによりXhoIを導入した。このプラスミドのXhoIサイトにpPGKPuro(Watanabe,



S., Kai, N., Yasuda, M., Kohmura, N., Sanbo, M., Mishina, M., and Yagi, T. (1995). ) の puromycin 耐性遺伝子を含む SalI 断片を挿入して pCAGGMP5-NotI を構築した。次にこのプラスミドから変異 DHFR (mdhfr) 遺伝子を含む SalI-NotI 断片を除き、代わりに pCAGGDN5-NotI の DHFR 遺伝子を含む SalI-NotI 断片を挿入して pCAGGDP5-NotI を構築した。pCAGGDP5-NotI の SalI サイトに PCR クローニングした P35 遺伝子の XhoI 断片を挿入し、目的の pCAGGDP5-p35 (図2) を構築した。

## 実施例 6

### [0052] (P35 遺伝子形質転換細胞)

実施例4で構築したP35発現プラスミドpCAGGDP5-p35を用いて以下に述べる方法にて、組換えフィブリノゲン産生クローン、CH002-24-4細胞を形質転換した。

CH002-24-4細胞を12well

プレートに  $1-0.5 \times 10^5$  cells/ml/well の細胞密度で CHO-S-SFMII 培地 (GIBCO-BRL) を用い播種した。リポソーム系形質転換試薬であるリポフェクトアミン2000 (インビトロジェン) を用いて、あらかじめ P35 発現プラスミド pCAGGDP5-p35 を PvuI で消化・線状化しておいたものを導入 DNA として、リポフェクトアミン2000 のプロトコールに従いトランスフェクションを行った。37℃、5%CO<sub>2</sub> 培養装置で一夜培養した後、選択培地として 4 μg/ml

puromycin (BD Bioscience) を含む CHO-S-SFMII 培地に交換した。3〜4日毎に培地を交換しながら 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培養装置で培養を続けることで選択を行い、形質転換体を得た。

[0053] 導入したP35遺伝子の効果を調べるために、得られたP35遺伝子形質転換体の一つであるP9GD細胞とその親株である2-24-4細胞をCHO-S-SFMII培地100mlに約  $1.0 \times 10^5$  cells/ml で播種し、techne社製のスピナーフラスコを用いた約2週間の浮遊培養(回転数45rpm)を行い、増殖曲線、生存率、フィブリノゲン産生量を調べた。その結果、図3に示すように、最大細胞密度でP9GD細胞が  $2.2 \times 10^6$  cells/ml、2-24-4細胞が  $7.2 \times 10^5$  cells/ml と約3倍に増加していた。また、P9GD細胞が50%生存率に達するのが2-24-4細胞に比べ3日遅くなった。結果として、培養15日目の産生量は、P9GD細胞が 365.2 μg/ml に対し2-24-4細胞は 162.7 μg/ml となり約2.2倍に増加した。さらに

、CHO-S-SFMII培地を基本とし栄養成分を強化した改良型無血清培地を用いて同様にスピナー培養を行ったところ、図4に示すように生存率ではほとんど差が無かったが、最大細胞密度ではP9GD細胞の $2.5 \times 10^6$  cells/mlに対し、2-24-4細胞が $9.4 \times 10^5$  cells/mlと約2.6倍に増加していた。さらに、培養15日での産生量については、P9GD細胞が $463.7 \mu\text{g/ml}$ に対し2-24-4細胞は $295.6 \mu\text{g/ml}$ となり約1.6倍に増加した。

- [0054] P9GD細胞のクローニングを行った。CHO-S-SFMII培地を基本とした改良型無血清培地に細胞を懸濁し、96wellプレートに50個/ $200 \mu\text{l/well}$ ずつ播種することでクローニングを行った。得られたクローンP9GD-10Cについて、P9GD細胞と同様にCHO-S-SFMII培地を基本とし栄養成分を強化した改良型無血清培地を用いて同様にスピナー培養を行ったところ、生存率、到達生細胞密度には差が無く、培養13日での産生量が $631.5 \mu\text{g/ml}$ となり、2-24-4細胞の $239.8 \mu\text{g/ml}$ に対して約2.6倍に増加した(図5)。生存率、生細胞数に差がないことからP35の抗アポトーシス作用ではなく、P35のもつタンパク質合成増強作用によって産生量が増大したと考えられた。

課題を解決するための手段の項で述べたように本発明以前に知られていたフィブリノゲンの最大産生量は約 $15 \mu\text{g/ml}$ であったが、本発明によりP35遺伝子を導入した場合、スピナー培養レベルで $631.5 \mu\text{g/ml}$ となり、約42倍の産生量増強効果がもたらされた。また、P35遺伝子導入の親株となった2-24-4細胞の潜在的なフィブリノゲン産生能力が $440 \sim 1520 \mu\text{g/ml}$ 以上と推定されているので、P35遺伝子が導入された場合には約1.6～2.6倍の効果があることから、単純計算で約 $704 \sim 3952 \mu\text{g/ml}$ の潜在的な産生量をもつと推定される。このように、本願発明の方法により確立された細胞がこれまでにないタンパク質を高産生する組換え動物細胞であることが示された。

## 実施例 7

- [0055] (組換えエカリン産生細胞へのP35遺伝子導入)

エカリンはEchis carinatusより単離精製された(T. Morita等: J. Biochem. 83, 559-570, 1978)蛇毒由来のプロテアーゼで、プロロンビンの特異的に活性化することが知られている。このエカリンcDNAを発現させたSP2/0マウスミエローマ細胞(特願2001-206918)にP35遺伝子を導入し、その効果を調べた。

組換えエカリン産生SP2/0細胞を冷却したダルベッコPBS(－)で2回洗浄した後、

PBS(-)0.8

mlに懸濁した $10^7$ 個の細胞をElectroporation用キュベット(電極幅0.4 cm、BIO-RAD社製)に入れた。前述の線状化したP35遺伝子発現プラスミド40

$\mu$ gを加えピペットで混合した。Gene Pulser II(BIO-RAD社製)を用い、0.22 kv、975  $\mu$ Fで1回パルスを加えた。キュベットを氷上10分間冷却した後、細胞懸濁液を10%ウシ胎児血清(FCS)を含む核酸含有MEMアルファ培地で約5,000個/50

$\mu$ lとなるように希釈し、96穴プレート5枚に50  $\mu$ l/wellずつ播種し、35°C、3%CO<sub>2</sub>培養装置で一夜培養した。翌日10%FCSを含むMEMアルファ培地を50

$\mu$ l/well添加しさらに一夜培養した。翌日8  $\mu$ g/mlのPuromycin及び10%FCSを含むMEMアルファ培地を100  $\mu$ l/well添加した。10日～14日間培養の後、出現した形質転換体をwell毎に産生能評価を行った。最も産生量の高かった2つのwellの細胞、P35-44、P35-67を10%FCSを含むMEMアルファ培地でshake

flask 培養(30mlスケール、1000回転/min)を行い、P35遺伝子導入前の細胞と産生量を比較した。その結果を図6に示す。11日間の培養で細胞増殖、生存率については導入前の細胞とほとんど差は無いが、むしろ低下する傾向を示した。しかし、産生量については、導入前細胞の5.96U/mlに対してP35-44細胞が12.8U/ml、P35-67細胞が18.8U/mlと2.1～3.2倍の増強効果を示した。このように、バキュロウイルスP35はアポトーシス抑制効果を示さないケースでも産生増強作用を示した。

## 実施例 8

### [0056] (組換え第VIII因子産生細胞へのP35遺伝子導入)

第VIII因子は血液凝固内因系に関与し、正常の止血機構を維持するために重要な凝固因子で、その先天性の活性欠乏は血友病Aと呼ばれる伴性劣性遺伝の凝固障害症を惹起する。この第VIII因子cDNA遺伝子を発現するBHK21細胞にP35遺伝子を導入し、P35遺伝子の効果を調べる検討を行った。

第VIII因子遺伝子は、J. Gitschierらの文献(Nature, 312, 326, 1984)の核酸塩基配列に従い、Human Liver cDNA(BD Bioscience)を鋳型として、プライマーとして配列番号14および15を用い、Advantage-GC2 Polymerase Mix(BD Bioscience)を用いてPCR反応を行った。PCR産物の核酸塩基配

列が文献通りであることを確認した後、最終的にXhoIとSalIで切断し、pCAGG-S1 dhfr neo (WO 03/004641) のSalIサイトに挿入して第VIII因子発現ベクターを構築した。BHK21細胞に第VIII因子遺伝子発現プラスミドを実施例7と同様の方法でトランスフェクション・形質転換細胞の作製を行った。培地は10%透析FBSを含むEX-CELL325 培地(JRH)を用い、選択はダブルセレクション(G418、MTX 0.5  $\mu$  M、MTX 0.75  $\mu$  M)で行った。さらに、得られた生産株を用いてMTXによる遺伝子増幅を実施した。培地にEX-CELL325を用い、0.5  $\mu$  MのMTX濃度から始め、段階的にMTX濃度を引き上げ、最終的には10  $\mu$  M MTX濃度で約5倍に産生量がアップした第VIII因子産生細胞を得た。これらの細胞を限界希釈法によりクローニングを行って、今回の実施例に使用した安定的に第VIII因子を産生するKMT株を得た。

- [0057] このKMT細胞に、実施例6で示した方法によりP35遺伝子発現プラスミドを導入した。pCAGGDP5-p35をPvuIで切断後、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて導入した。選択培地として Puromycinを含むEX-CELL325を用い、12 well plateにて選択を行った。得られた形質転換細胞を細胞数を合わせて播種し(1x10<sup>5</sup>/ml/well of 24 plate)、3日目に培養上清を回収して、親株と比較することにより産生量増強効果の検討を行った。その結果、P35遺伝子を導入した細胞はいずれも親株であるKMT細胞より発現量が高くなり、特に下表に示すような細胞では2.4〜4.4倍の増加をもたらした。これらの細胞はいずれも生存率が90%以上であることからP35の抗アポトーシス作用ではなく、P35のもつタンパク質生合成増強作用によって産生量が増大したと考えられた。

[表2]

細胞	生存率 %	産生量 mU/10e5	倍率
KMT	92.4	21.8	1.0
KMTP-1	90.2	95.0	4.4
KMTP-2	94.1	64.1	2.9
KMTP-7	90.8	66.4	3.0
KMTP-9	96.5	55.2	2.5
KMTP-10	97.2	52.2	2.4

## 産業上の利用可能性

[0058] 本発明を使用すれば目的タンパク質を高生産することが可能となるので、本発明は組換え技術によってタンパク質を大量に製造する必要がある医薬品産業やバイオリアクターや洗剤などにタンパク質を大量に必要とするその他の産業にとって利用価値の高いものである。中でも、医薬品や研究用の試薬には動物細胞でなければ生産できない種類のタンパク質が多くあるので、とりわけ有用である。さらに、本発明は従来行われてきた動物細胞の培養条件下でも効果を発揮するので、既存設備を利用してタンパク質の高生産が可能となる。また、本発明により得られるタンパク質遺伝子導入前のカススペース活性阻害作用及び/又はタンパク質生合成活性増強作用をもつ因子をコードする遺伝子による形質転換細胞は、産生させる目的のタンパク質遺伝子を導入するのみで目的とするタンパク質を大量に生産することが可能となるため、幅広い分野で幅広い目的タンパク質の生産に利用可能となる。

[0059] 特に本願発明により得られる組換えエカリン産生細胞や、組換え第VIII因子産生細胞、組換えフィブリノゲン産生細胞は、エカリンや、第VIII因子、フィブリノゲンを高生産するので、これまで動物や人の血液由来の製剤に比べて、格段に安全性が向上し、供給も安定的になる。これらのタンパク質は、単独で又は他のタンパク質や種々の安定剤、保護剤、防腐剤等の添加物と共に用いることにより、各種疾病に対する病態悪化阻止、予防または治療剂等医薬品の提供を可能ならしめるものである。例えば、本願発明によって得られるフィブリノゲンの場合、DICのような、血液凝固因子の消費状態の改善や先天性および後天性のフィブリノゲン欠乏症における補充療法に使用される。また、本願発明によって得られるヒトフィブリノゲンとエカリンによって調製されるトロンピンは、フィブリンの膠着性を利用して組織接着剤として、止血、創傷部位の

閉鎖、神経、腱、血管や組織などの接着または縫合補強、肺におけるエアリークの閉鎖など広範にわたる治療、あるいは組織再生を目的とした再生医療の基剤に対する好適な薬として利用される。また、これらのタンパク質は、医薬品はもとより、モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製する際の抗原として、あるいは試薬そのものとして血液凝固・線溶に関連した研究の進展に有用である。

このように、本願発明の方法により得られる組換えタンパク質高産生細胞及び当該組換え動物細胞により得られるタンパク質は、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

## 請求の範囲

- [1] 動物細胞に産生量増強因子をコードする遺伝子を導入し、形質転換させたことを特徴とする組換え動物細胞。
- [2] 動物細胞にタンパク質産生遺伝子と産生量増強因子をコードする遺伝子を導入し、形質転換させたことを特徴とする組換え動物細胞。
- [3] 該産生量増強因子がカススペース活性阻害活性及び/又はタンパク質生合成活性増強作用を持つ因子であることを特徴とする請求項1又は2記載の組換え動物細胞。
- [4] 該カススペース活性阻害活性及び/又はタンパク質生合成活性増強作用を持つ因子をコードする遺伝子がウイルス由来の、バキュロウイルスP35遺伝子、牛痘ウイルスcrmA遺伝子、ヘルペスウイルス由来のv-FLIP遺伝子、バキュロウイルスv-IAP遺伝子、アデノウイルスAd14.7遺伝子からなる群より選択されることを特徴とする請求項3記載の組換え動物細胞。
- [5] 該カススペース活性阻害活性及び/又はタンパク質生合成活性増強作用を持つ因子をコードする遺伝子がバキュロウイルスを除くウイルス及び動物細胞由来のバキュロウイルスIAP反復配列を持つIAPファミリー遺伝子であることを特徴とする請求項3記載の組換え動物細胞。
- [6] 動物細胞が、哺乳動物由来の細胞であることを特徴とする請求項1ないし5の何れかに記載の組換え動物細胞。
- [7] 哺乳動物由来細胞が、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、マウスミエローマ細胞、BHK細胞、293細胞及びCOS細胞からなる群より選択されることを特徴とする請求項6記載の組換え動物細胞。
- [8] 哺乳動物由来細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)DG44株、BHK21株、マウスミエローマSP2/0株の何れかであることを特徴とする請求項7記載の組換え動物細胞。
- [9] 該タンパク質遺伝子と産生量増強因子の両方あるいは何れかをコードする遺伝子を発現させるための発現ベクターの構成要素が、SV40初期プロモーター、SV40後期プロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター及びニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーターからなる群より選択されるプロモーター並びに、アミノグリコシド3'ホスホトランスフェラ

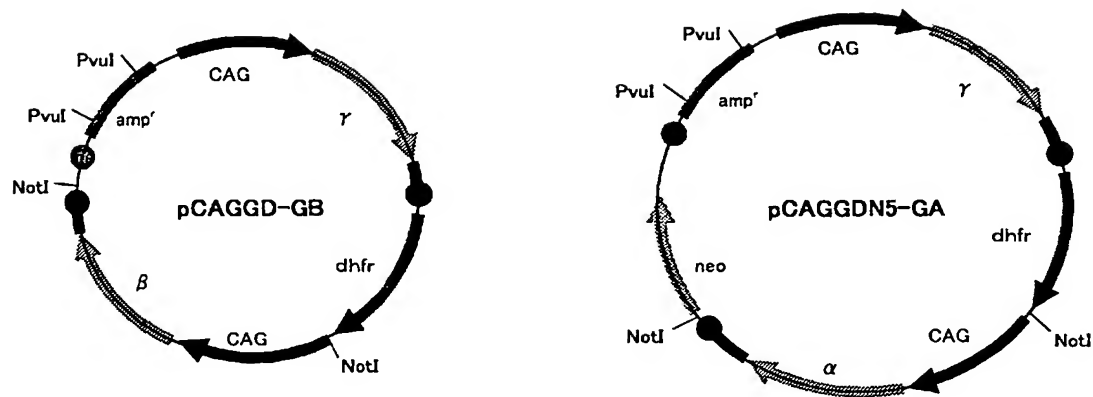
ーゼ(neo)遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子及びグルタミン合成酵素(GS)遺伝子からなる群より選択されるマーカー遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項1ないし8の何れかに記載の組換え動物細胞。

- [10] ニワトリ $\beta$ -アクチンプロモーター及びバキュロウイルスP35遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項1ないし9の何れかに記載の組換え動物細胞。
- [11] サイトメガロウイルスエンハンサー及びバキュロウイルスP35遺伝子を有する発現ベクターを用いることを特徴とする請求項1ないし9の何れかに記載の組換え動物細胞。
- [12] 産生されるタンパク質が分泌タンパク質であることを特徴とする請求項1ないし11の何れかに記載の組換え動物細胞。
- [13] 産生されるタンパク質がエカリンであることを特徴とする請求項12記載の組換え動物細胞。
- [14] 産生されるタンパク質が血液中に存在するタンパク質であることを特徴とする請求項1ないし11の何れかに記載の組換え動物細胞。
- [15] 産生されるタンパク質がフィブリノゲンであることを特徴とする請求項12又は14記載の組換え動物細胞。
- [16] 産生されるタンパク質が第VIII因子であることを特徴とする請求項12又は14記載の組換え動物細胞。
- [17] 該タンパク質産生遺伝子がフィブリノゲン遺伝子、エカリン遺伝子、第VIII遺伝子から選ばれる一の遺伝子であり、該産生量増強因子をコードする遺伝子がバキュロウイルスP35であることを特徴とする請求項1又は2記載の組換え動物細胞。
- [18] 請求項1ないし17の何れかに記載の組換え動物細胞を用いてアポトーシスを誘導しない条件下の培養方法で培養することによりタンパク質を大量産生する方法。
- [19] 該培養方法が、フェドバッチ培養方法、灌流培養方法、栄養強化培地を用いた培養方法の何れかであることを特徴とする請求項18記載のタンパク質を大量産生する方法。
- [20] 無血清培地を用いることを特徴とする請求項18又は19の何れかに記載のタンパク質を大量産生する方法。

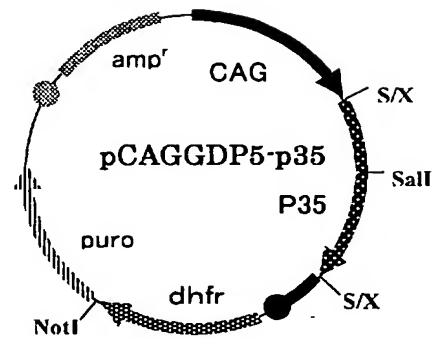


- [21] タンパク質の産生量を約4000  $\mu$ g/mlまで増加させ得ることを特徴とする請求項18ないし20の何れかに記載の方法。
- [22] 請求項1ないし17の何れかに記載のタンパク質高産生組換え動物細胞の作製方法であって、動物細胞にタンパク質産生遺伝子と産生量増強因子をコードする遺伝子を同時または異なる時期に導入し、形質転換させたことを特徴とする組換え動物細胞の作製方法。
- [23] 請求項1ないし17の何れかに記載の組換え動物細胞を用いて高産生されたタンパク質。

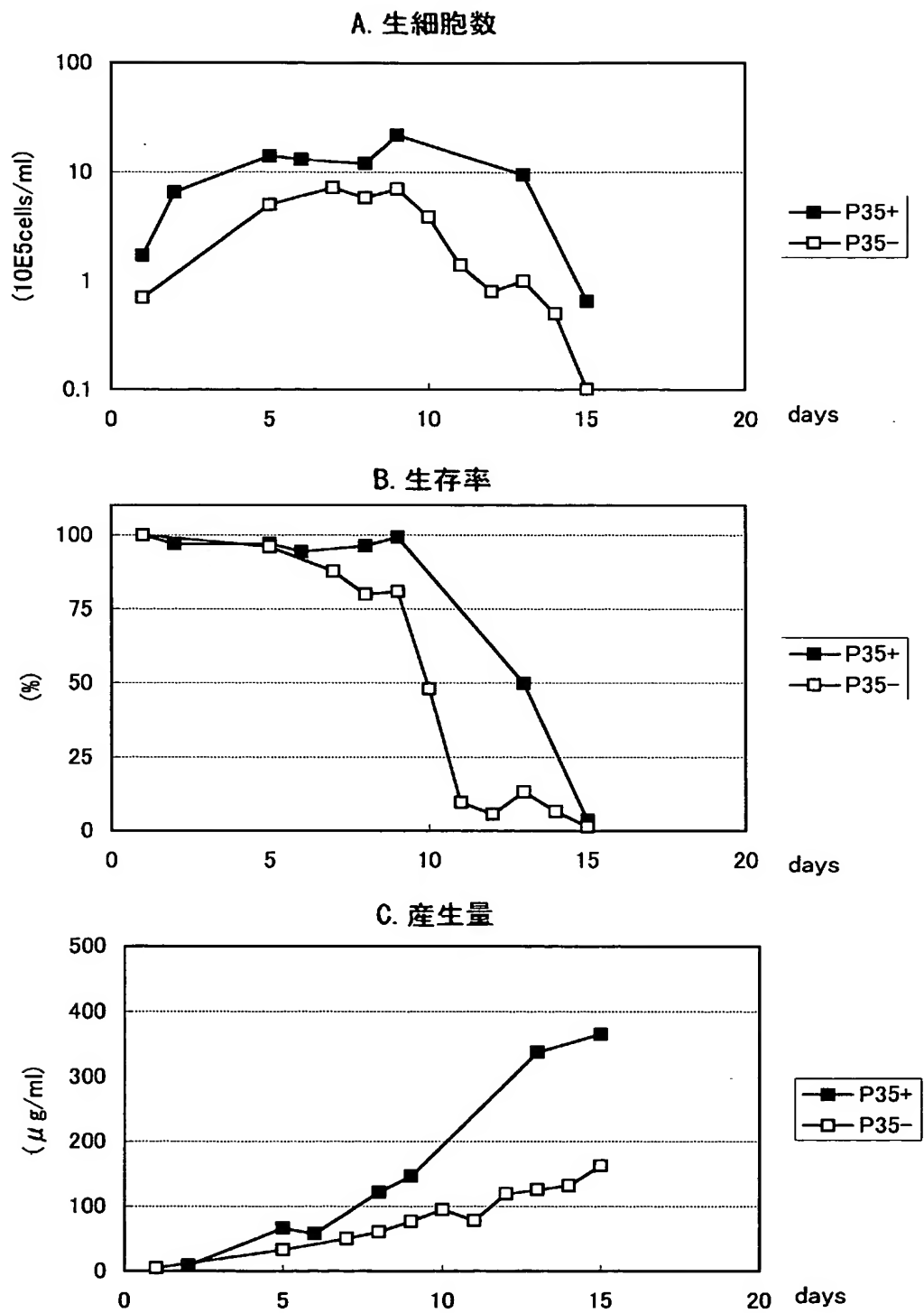
[図1]



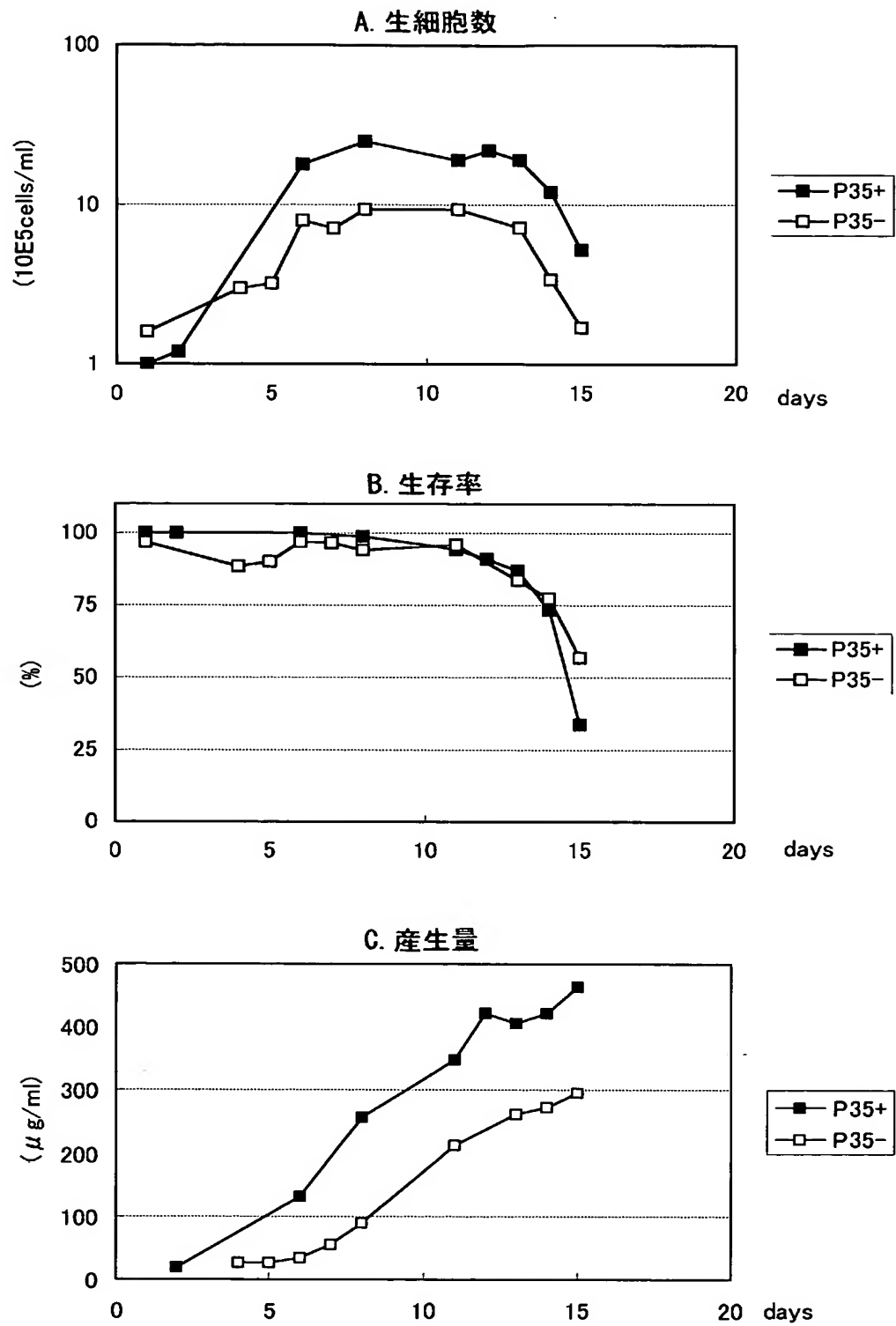
[図2]



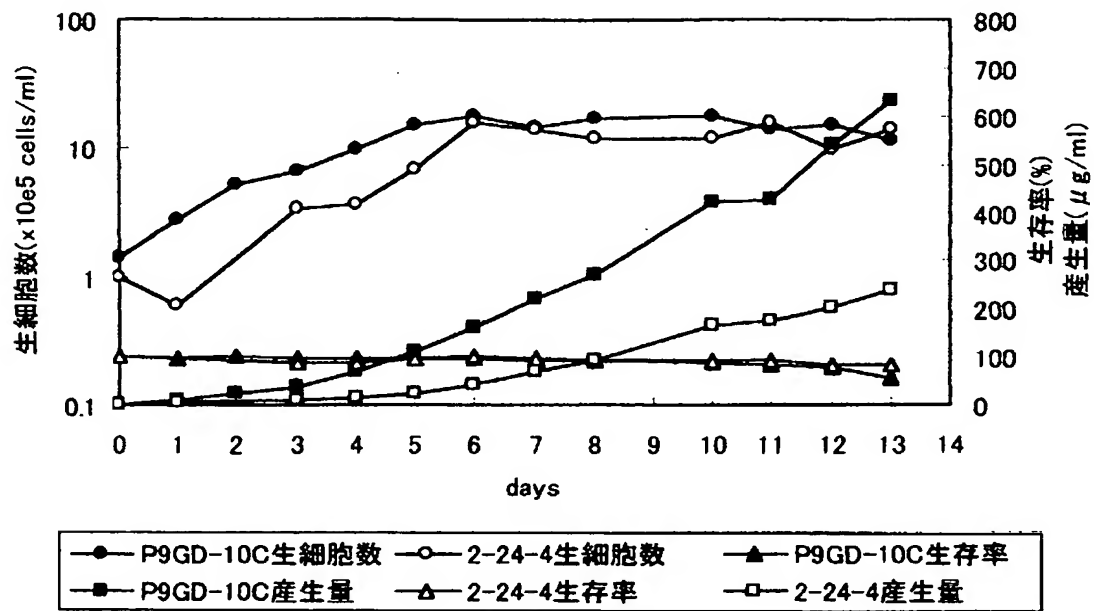
[図3]



[図4]

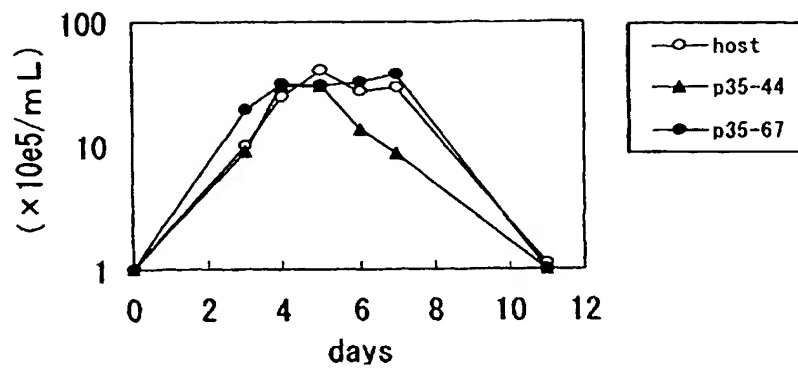


[図5]

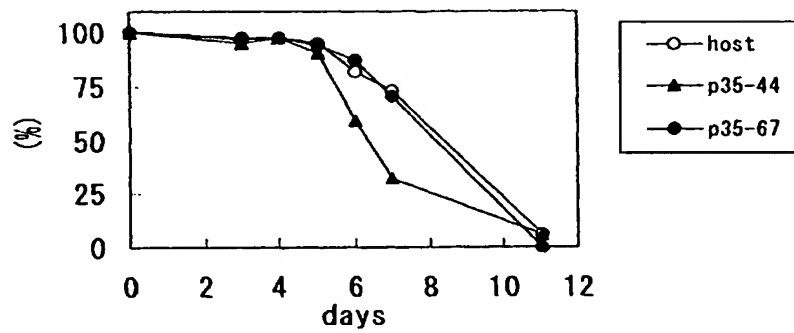


[図6]

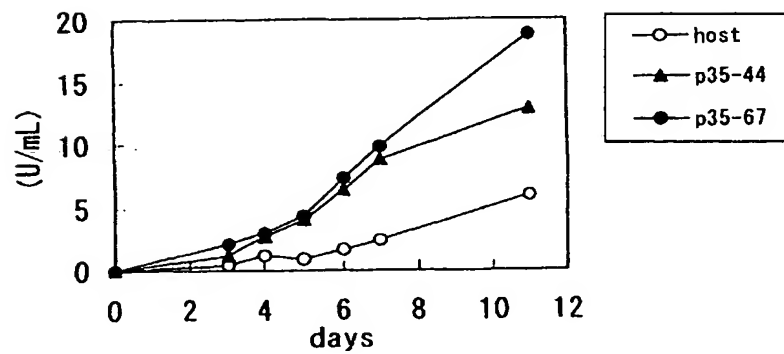
## A. 生細胞数



## B. 生存率



## C. 産生量



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015594

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/10, C07K14/745, C12N15/12, C07K14/46, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N5/10, C07K14/745, C12N15/12, C07K14/46, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2003-510087 A (Genentech, Inc.), 18 March, 2003 (18.03.03), Full text & WO 01/23592 A2 & EP 1220934 A2 & US 6586206 B1	<u>1-22</u> 23
<u>X</u> A	Lin G. et al., Stable cell lines expressing baculovirus P35: resistance to apoptosis and nutrient stress, and increased glycoprotein secretion, In Vitro Cell Dev.Biol.Anim., 2001, Vol.37, No.5, pages 293 to 302	<u>1-22</u> 23
<u>X</u> A	Greenberg C.S. et al., Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting, J.Clin. Invest., 1985, Vol.75, No.5, pages 1463-1470	23 <u>1-22</u>

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 February, 2005 (02.02.05)Date of mailing of the international search report  
22 February, 2005 (22.02.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015594

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	Roy S.N. et al., Assembly and secretion of recombinant human fibrinogen, J.Biol.Chem., 1991, Vol.266, No.8, pages 4758 to 4763	<u>23</u> 1-22
<u>X</u> A	Morita T. et al., Purification and properties of prothrombin activator from the venom of Echis carinatus, J.Biochem., 1978, Vol.83, No.2, pages 559 to 570	<u>23</u> 1-22



The substance as set forth in claim 23 is specified as "a protein high-produced by using a recombinant animal cell as set forth in any of claims 1 to 17" and, therefore, involves any proteins produced by using these animal cells.

However, fibrinogen, ecarin and factor VIII are exclusively disclosed in the description as proteins produced by using these animal cells. Although the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, the scope of substances obtained by the screening method cannot be specified. Thus, claim 23 is described in an unclear manner.

Such being the case, the search was made on fibrinogen, ecarin and factor VIII which are specifically presented in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C12N5/10, C07K14/745, C12N15/12, C07K14/46, C12P21/02		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. <sup>7</sup> C12N5/10, C07K14/745, C12N15/12, C07K14/46, C12P21/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
JSTPlus(JOIS) BIOSIS/WPI(DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 2003-510087 A (ジェネンテック・インコーポレーテッド) 2003.03.18, 全文 & WO 01/23592 A2 & EP 1220934 A2 & US 6586206 B1	<u>1-22</u> 23
<u>X</u> A	Lin G. et al., Stable cell lines expressing baculovirus P35: resistance to apoptosis and nutrient stress, and increased glycoprotein secretion, In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., 2001, Vol. 37, No. 5, pages 293-302	<u>1-22</u> 23
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.02.2005	国際調査報告の発送日 22.2.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子	4N 3126
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	Greenberg C. S. et al., Cleavage of blood coagulation factor XIII and fibrinogen by thrombin during in vitro clotting, J. Clin. Invest., 1985, Vol.75, No.5, pages 1463-70	<u>23</u> 1-22
<u>X</u> A	Roy S. N. et al., Assembly and secretion of recombinant human fibrinogen, J. Biol. Chem., 1991, Vol.266, No.8, pages 4758-63	<u>23</u> 1-22
<u>X</u> A	Morita T. et al., Purification and properties of prothrombin activator from the venom of Echis carinatus, J. Biochem., 1978, Vol.83, No.2, pages 559-70	<u>23</u> 1-22

請求の範囲23に記載の物質は、「請求項1ないし17の何れかに記載の組換え動物細胞を用いて高産生されたタンパク質」と特定されており、当該組換え動物細胞を用いて産生されるあらゆるタンパク質を包含するものである。

しかしながら、当該組換え動物細胞を用いて産生されるタンパク質として、明細書に具体的に開示されているものは、フィブリノゲン、エカリン、第Ⅷ因子のみである。また、出願時の技術常識を勘案しても、当該スクリーニング方法で得られる物質の範囲を特定できないから、請求の範囲23の記載は不明確である。

したがって調査は、明細書に具体的に記載されている、フィブリノゲン、エカリン、第Ⅷ因子について行った。